

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-283282

(43)公開日 平成8年(1996)10月29日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 G 17/00			C 0 7 G 17/00	C
// A 6 1 K 39/02			A 6 1 K 39/02	
			39/05	
			39/09	
			39/095	
審査請求 有 発明の数 1 O L (全 20 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平8-22882	(71)出願人	596017934
(62)分割の表示	特願昭62-502838の分割		プラクシス バイオロジックス、 インコ
(22)出願日	昭和62年(1987) 5 月 1 日		ーポレーテッド
			アメリカ合衆国 ニューヨーク州 14623
			ロチェスター、コーポレート ウッズ
(31)優先権主張番号	8 5 9 9 7 5		30
(32)優先日	1986年 5 月 5 日	(72)発明者	アンダーソン, ポーター ダブリュー
(33)優先権主張国	米国 (U S)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 14620
			ロチェスター, アルパイン ストリート
			40
		(74)代理人	弁理士 平木 祐輔
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 莢膜ポリマーフラグメントの製造方法

(57)【要約】

【課題】架橋された免疫原性複合体の製造において使用するのに適した、少なくとも2個のカルボニル基を有する莢膜ポリマーフラグメントを提供する。

【解決手段】細菌性病原体の莢膜ポリマーを酸、塩基または酵素で処理すること、および酸化剤で処理してカルボニル基を生成させることからなる、架橋された免疫原性複合体の製造において使用するのに適した、少なくとも2個のカルボニル基を有する莢膜ポリマーフラグメントの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】細菌性病原体の莢膜ポリマーを酸、塩基または酵素で処理すること、および酸化剤で処理してカルボニル基を生成させることからなる、架橋された免疫原性複合体の製造において使用するのに適した、少なくとも2個のカルボニル基を有する莢膜ポリマーフラグメントの製造方法。

免疫原性複合体

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

1. 発明の分野

本発明は、例えば、ヘモフィルス・インフルエンザb型[Haemophilus influenzae type b]、エシェリキア・コリ[Escherichia coli]、ナイセリア・メニンギチジス 血清グループAおよびC[Neisseria meningitidis serogroups A and C]、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型3, 6, 12, 14, 19, 23および51[Streptococcus pneumoniae serotypes 3, 6, 12, 14, 19, 23 and 51]、ならびにシュドモナス[Pseudomonas]などを含む細菌により引き起こされる感染および疾患に対する、新規なワクチン組成物、その製造プロセスおよび人類を含む若い恒温動物の免疫化の方法に利用できる莢膜ポリマーフラグメントの製造方法に関連するものである。

【0002】

【従来の技術】

2. 発明の背景

精製された微生物莢膜ポリマー(CP)は成熟したヒトおよび動物において一般的に免疫原性であり、そして相応する全身性感染に対するワクチンとして用いられ得ることが公知である。この適用において用いられた場合、「莢膜ポリマー」なる用語は、糖のポリマー、糖酸のポリマー、アミノ糖のポリマー、多価アルコールのポリマーおよび糖リン酸塩のポリマーなどのような、糖含有ポリマーに関するものであり、アミノ酸含有ポリマーに関するものではない。これらの「莢膜ポリマー」は、グリコシド結合以外の結合および上記に列挙したような糖以外の成分を含むものではあるが、医学上において「莢膜多糖」と呼称される。異なる細菌の莢膜ポリマーはヒトの第1年における免疫原性において広範に変化する。いくつかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型3[Streptococcus pneumoniae serotype 3]およびナイセリア・メニンギチジス血清グループA[Neisseria meningitidis serogroup A]などのように穏健な活性である。被包性細菌[encapsulated bacteria]による全身性感染に対する感性は、生命体の第1年においてより大きなものである。幼児における多くの細菌莢膜ポリマーに対する免疫原性応答は、年齢依存である、すなわち莢膜ポリマー(CP)に対する免疫適格性は、

約第6年齢までに成人のレベルへ増加する。不活性なCPは、ヘモフィルス・インフルエンザb型、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型6および12、ならびにナイセリア・メニンギチジス血清グループCのものである。幼児において中間の応答を与えるCPの例としては、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型19および51がある。

【0003】2.1 ワクチンにおける抗原としての完全な莢膜ポリマー

数々の研究者がワクチンにおいてないしはワクチンとして有用である完全な莢膜ポリマーを単離し精製している。例えば米国特許第4,220,717号は、ヘモフィルス・インフルエンザbの莢膜ポリマーからの免疫学的に活性なポリリボシルリビトール ホスフェート(PRP)の単離および精製に関するプロセスを述べている。さらに、米国特許第4,210,641号は、200,000ドルトンより大きな見かけ分子量を有し、そして主としてガラクトース、グリコースおよびマンノースからなり、また少量のオサミンを含有するヘモフィルス・インフルエンザの多糖抽出物に関連するものである。

【0004】幾人かの研究者が、よりよい免疫学的応答を達成するために、これらのおよびその他の完全な莢膜ポリマーを処方箋において利用している。例えば米国特許第4,196,192号は、精製された完全PRPおよび完全ボルデテラ・パータッシス[Bordetella pertussis]細菌を含むワクチンを開示している。免疫原性を増加させるためのこのアプローチは、若い哺乳動物において、抗PRP抗体および抗パータッシス抗体の高められたレベルをまねくものであった。

【0005】2.2 複合体を含有するワクチン

他の研究者たちは、いわゆる「担体効果[carrier effect]」により抗体形成を高める努力において、莢膜ポリマーの担体タンパク質への複合[conjugation]を研究している。例えばシュネールソンら、ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン 152:361-376(1980年)[Schneerson et al., Journal of Experimental Medicine 152:361-376(1980)]は、ヘモフィルス・インフルエンザbポリマー-タンパク質複合体[conjugate]が、ヘモフィルス・インフルエンザbによって引き起こされた侵入性疾患に対する免疫性を与えることを明らかにしたことを述べている。この引用文は、幼児における莢膜ポリマーの年齢に関連する免疫学的挙動を事実として提供し、また血清アルブミン、カプトガニ ヘモシアニン[Limulus polyphemus hemocyanin]およびジフテリア毒素を含む種々のタンパク質との完全莢膜ポリマーの複合によりこの年齢依存性を克服しようと努めるものである。複合の方法は、アジピン酸ジヒドラジドなどのような結合剤の使用を包含するものである。

【0006】ゲヤーら、メド、マイクロバイオル、イム

ノル、165:171~288(1979年)[Geyer et al., Med. Microbiol. Immunol. 165:171~288(1979)]は、還元アミノ化によってあるクレブシエラ・ニューモニエ[Klebsiella pneumoniae] 莢膜多種フラグメントのニトロフェニルエチルアミンリンカーへの複合体を調製し、そして次に、アゾカップリングを用いてこの誘導体化された糖はタンパク質に付着された。

【0007】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するための手段】

3. 発明の概要

本発明は、細菌莢膜ポリマー由来の莢膜ポリマーフラグメントの製造方法に関連し、この莢膜ポリマーフラグメントは、細菌の毒素またはトキシイドと、還元アミノ化により、共有結合させることができる。本出願において用いられる場合、「トキシイド」なる用語は、毒素の抗原性を毒素の毒性なしに有している毒素の形態を意味するものである。

【0008】本発明の免疫原性複合体は、莢膜ポリマーのフラグメントにおける還元末端基を最初に形成し、そしてこれらを細菌の毒素またはトキシイドのアミン基と還元アミノ化によって反応させることによって調製される。還元末端基は、選択加水分解(例えば酸または酵素による)含む任意の適当な方法によって、あるいは酸化的開裂(例えば過ヨウ素酸塩または同類の酸素酸による)によって形成され得る。この複合体は、シアノボロハイドライドアニオンを含有する水溶液中における還元アミノ化によって好ましく達せられる。

【0009】本発明の免疫原性複合体は、ヒトを含む若い哺乳動物において有効なレベルの抗莢膜抗体形成を引き出すワクチンを製造するために、薬理的に許容できる担体とともに処方され得る。このワクチンは、免疫応答可能な量の該複合体を哺乳動物に投与することによって、それぞれの莢膜性細菌によって引き起こされた若い哺乳動物における全身性感染に対する能動免疫化を誘導することに利用され得る。

【0010】この免疫原性複合体は、莢膜ポリマーのみよりも低い年齢依存性であることが見い出されており、またそれぞれの莢膜性細菌による全身性感染に対する非常に若い恒温哺乳動物の能動免疫化に役立つ。さらにまた、本発明の免疫原性複合体は、炭水化物をタンパク質に複合するのに用いられてきたアジピン酸ジヒドライドあるいはP-ニトロフェニルエチルアミンのような潜在的に毒性の結合剤を含まないものである。

【0011】最後に、本発明の免疫原性複合体は、莢膜ポリマーのフラグメントを含むものであって、完全な莢膜ポリマーを含むものではない。莢膜ポリマーの高度な反復構造は、ある程度、幼児における抗体産生能を拡大できないことの原因となりうる。完全な(高度に重合さ

れた)CPとタンパク質の複合体は、CPのみの場合の免疫学的欠点をほんの部分的に克服するにすぎないであろう。

【0012】一方、担体上の莢膜ポリマーフラグメントの使用は、反復構造の欠点を避けるものである。さらにCPフラグメントを有する複合体のCP決定基は、完全CPを有する複合体のCP決定基よりも平均して担体により近接しており、そして担体へのこの近接は、より効果的な「担体効果」に必要とされうる。タンパク質担体に関して、さらに利点は、子供が、定期的に予防接種される、例えば破傷風あるいはジフテリアなどのような、細菌の毒素またはトキシイドの使用にある。毒素またはトキシイドに対する望まれた免疫は、莢膜ポリマーに関連した病原体に対する免疫といっしょに導き出される。

【0013】記載された結果を説明するためのいかなる理論に対する本願明細書を通じての言及も本発明の範囲を限定するものではないことを理解すべきである。本発明が作用するための方法に依存することなく、ここに記載された結果および利点は、下記の詳細な説明を参考にして達成されうる。

4. 発明の詳細な説明

本発明の複合体は、莢膜ポリマーフラグメントの還元末端基を細菌毒素またはトキシイドの第1アミノ基に反応させて、担体タンパク質に共有結合した莢膜ポリマーの抗原決定基を得ることによって形成される。該還元基は選択加水分解または特定の酸化的開裂または両者の組合せによって形成され得る。

【0014】少なくとも1つの還元末端を有する抗原性フラグメントは、特定の莢膜ポリマーの構造的特徴に依存して、種々の方法によって莢膜ポリマーから生成されることができる。過ヨウ素酸塩(あるいはパラ過ヨウ素酸、メタ過ヨウ素酸ナトリウムおよびメタ過ヨウ素酸カリウムのような同類試薬)による限定された酸化的開裂は、アルデヒド末端を残す。このようなアプローチは、近接のジヒドロキシ基を有するポリマーに限られるであろう。グリコシド結合の加水分解は、還元糖末端を生成する。このような加水分解は、グリコシダーゼによって最も特異的に酸素的に行なわれ得るが、この適用は、それに対するグリコシダーゼが知られている、例えばストレプトコッカス・ニューモニエ8[Streptococcus pneumoniae 8]などのような比較的数の少ない莢膜ポリマーに限定されるであろう。酸による加水分解は、グリコシド結合の加水分解に一般的に用いられる。このアプローチの有用性は、ポリマーが酸感受性非グリコシド結合を有する場合あるいはポリマーが抗原特異性に重要な酸感受性分岐結合[branch linkage]を含有する場合には限定される。多糖類がホスフェート、スルフェートまたはエステル結合のようなグリコシド性炭素に対する塩基不安定結合を有している場合には、塩基加水分解も使用できる。この方法の有用性は、該ポリマーが他の塩基

感受性非グリコシド性結合を有している場合には制限される。

【0015】ある種の莢膜ポリマーは、過ヨウ素塩（または同類の酸素酸類）により開裂を受けやすい近接のジヒドロキシ基を欠いていることがある。しかしながら、このような莢膜ポリマーの酸、塩基または酵素による先行する加水分解は、通常酸化開裂を受けやすいであろう近接のジヒドロキシ基を遊離することがある。例えば、酸加水分解によるヒルビン酸、酢酸塩、ギ酸塩等の除去あるいは酵素開裂によるシアリン酸の除去は、酸化性開裂工程の前に行なうことができる。もちろん、これは変性された基が抗原性特異性に対して重要でないこれらの莢膜ポリマーへの適用に限られる。

【0016】この莢膜ポリマーが加水分解されてただ1個の官能性アルデヒド基を有する莢膜ポリマーフラグメントを形成する場合には、（少なくとも2個のフリーなアミン基を有する）多官能タンパク質への複合体化は、タンパク質の単分子が共有的に結合している1個またはそれ以上の莢膜ポリマーフラグメントを有する複合体を生ずることになる。タンパク質に結合する莢膜ポリマーフラグメントの数は、タンパク質に対する莢膜ポリマーフラグメントの相対的濃度および反応体の全濃度を含む複合化反応の条件の変化により通常規制できることが容易に判る。もちろん、反応性または反応速度に影響するあらゆる反応パラメーター、例えば時間、温度、pH等の規制により、複合体の最終組成および構造が変わる。

【0017】莢膜ポリマーフラグメントがフラグメント（例えば非環状残基の近接ジヒドロキシ基の酸化開裂の結果として）の各端に位置する少なくとも1個の官能性アルデヒド基を有する場合には、多官能性タンパク質に対する複合は、種々のタイプの複合体を生じる。例えば、このような反応体の複合は、特にタンパク質に多数の遊離のアミン類があり、かつ莢膜フラグメントがタンパク質に対して低いモル過剰である場合に格子または網状構造を形成する能力を有している。架橋度および網状または格子の全体サイズは、複合反応の条件の通常の変更により規制できる。莢膜ポリマーフラグメントは、ヘモフィルス・インフルエンザ^b型、エシェリキア・コリ、ナイセリア・メニンギチジス血清型AおよびCを含むナイセリア・メニンギチジス、ストレプトコッカス・ニッモニエ血清型3、6、12、14、19、23および51を含むストレプトコッカス・ニッモニエ、ならびにシェードモナスのような細菌性病原体の莢膜ポリマーから誘導できる。

【0018】複合は、シュワルツとグレイ、アーク・バイオケム、バイオフィズ、181:542-549（1977年）[Schwartz and Gray, Arch. Biochem. Biophys. 181:542-549（1977）]の還元アミノ化プロセスによって行なわれる。簡単に述べると、このプロセスは、還元莢膜ポリマーフラ

グメントと細菌毒素またはトキシイドを、シアノボロハイドライドイオン、あるいは、目的の還元末端を還元することもまた毒素またはトキシイドや莢膜ポリマーに悪影響を及ぼすこともないその他の還元剤の存在下で反応させることを含むものである。

【0019】シアノボロハイドレートイオン（あるいはその同等物）は、第1に莢膜ポリマーフラグメントのカルボニル基とタンパク質のアミノ基との間で形成される Schiff 塩基 [Schiff base] 中間体の緩やかな選択的還元剤として作用する。このようなイオンの第2の影響は、複合が生じた後に莢膜ポリマーフラグメントに残るいかなる活性アルデヒド基のより緩慢な還元である。必要により複合後に、シアノボロハイドレートイオン（またはその同等物）を遊離の未反応アルデヒド基を還元するために添加することもできる。残っているカルボニル基の適切な還元を確実にするために、複合後に、より強い還元剤であるボロハイドライドイオンを添付することが望ましい場合が多い。

【0020】これゆえに、活性な分子が最終製品の一部を形成する結合剤によって結合される従来用いられていた複合法とは異なり、ここで利用された還元アニオンは、最終製品中に取込まれない。これは最終製品の潜在的毒性（すなわち、望ましくない免疫原性）を制御する見地から重要なことである。共有結合の証拠は、例えば、PRP部分と担体タンパク質との間の会合が、非共有結合を崩壊する極めて高い能力を有する8M尿素の存在下において、タンパク質の塩析にかかわらず持続するという事実によって示される。

【0021】好ましい担体タンパク質は、若い哺乳動物への投与に安全でありかつ担体として免疫学的に有効なものである。安全性は、一次毒性の欠如およびアレルギー性合併症の最小化された危険性を含むものである。ジフテリアおよび破傷風トキシイドはこれらの基準を満たすものである、すなわち適当に調製されると、これらは非毒性であり、そして、アレルギー性反応の発生率は十分に実証されている。アレルギー性反応の危険性が成人に関してかなり重要なものであるにもかかわらず、幼児に関しては最小化されている。

【0022】「担体効果」において、弱い抗原は、担体としてのより強い抗原（すなわち、異種タンパク質）に結合させることによって、それのみで存在するよりも免疫原性が高くなる。動物が予め該担体のみで免疫されている場合、担体抗原のみならず結合したより弱い抗原に対する高められた応答に関して「準備された [prime d]」ものとなる。幼児は破傷風およびジフテリア トキシイドで慣例的に免疫処置される。これゆえに、彼らは、これらのトキシイドのいずれかに複合された莢膜ポリマー抗原のその後の提示に関して準備されたものであろう。

【0023】通常、任意の異種タンパク質が担体抗原と

して働き得る。しかしながら、破傷風およびジフテリアなどのようなある種の細菌毒素は、これらが2つの部分から構成され、その一方(「結合[*binding*」]サブユニット)が、哺乳動物細胞表面へ結合するための強い親和力を有しているということにおいて、さらなる利点を有する。考えられるところでは、このような「結合」タンパク質への複合は、免疫系の細胞において、運搬される抗原により効果的な一次応答をなさせるものであろう。

【0024】莢膜ポリマーが複合される担体タンパク質は、天然の毒素または脱毒化された毒素(トキシイド)であり得る。また、比較的最近の変異技術によって、毒素と抗原性的に類似しているが、非毒性である遺伝的に変容されたタンパク質が産生されている。これらは「交差反応物質」またはCRMと呼ばれている。CRM₁₉₇は、これが天然のジフテリア毒素からの単一のアミノ酸変化を有するものであり、そしてそれと免疫学的に区別つかないものであることから、注目すべきものである。

【0025】CRM₁₉₇ タンパク質を産生するコリネバクテリウムジフテリア株C7 (*Corynebacterium diphtheria* strain C7) (β 197)は、メリーランド州ロックヴィル所在のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)に寄託されており、寄託番号ATCC 53281が付されている。

【0026】莢膜ポリマーの天然の毒素への複合は毒性を低減するであろうが、かなりの毒性が残存している可能性がある。これゆえにさらに脱毒性化が必要とされる。タンパク質毒素の常法の脱毒性化は、タンパク質の遊離アミノ基と反応するホルマリンを用いるものである。残留毒性が、さらに考慮される。さらにまた自発的な再毒性化が、ワクチンの任意の個々のロットであり得るものであり、そしてこのアプローチでの懸念の論争を残すものである。

【0027】あるいはまた、天然の毒素は、莢膜ポリマーへの複合の前に、慣用のトキシイドを生成するためにホルマリンで脱毒性化され得る。しかしながら、予めのホルマリン処理は、莢膜ポリマーフラグメントの還元基との反応に有効な遊離アミノ基の数を低減する。これゆえに、CRM類は、それらのアミノ基のいずれもホルマリンによって占拠されていない一方、生来の毒性を有していないということにおいて、重要な利点を有する。さらなる利点はCRM類による作用において何ら生物災害が存在しないことである。

【0028】免疫学的に天然の毒素と同一であるCRM₁₉₇の場合、ホルマリンでの処理(しかしながら、脱毒性化する必要はない。)は免疫学的応答を極めて高めるものである。これは、からだの機構による分解に対する分子の安定化および/または架橋による凝集に起因する

ものであると考えられる(粒子の免疫原性は、サイズと共に増加する)。

【0029】すべての上記の理由により、破傷風およびジフテリア毒素が、担体タンパク質として最良の候補であるが、さらに、同様に適切なその他のものもある。これらのその他のものは、ジフテリアおよび破傷風で見出された安全性の遍歴を有していないであろうが、これらを使用するためのその他の圧倒的な理由があるだろう。例えば、これらが、担体としてさらにより一層効果的である、あるいは製品経済性が著しいなどである。担体としてのその他の候補は、シュードモナス、スタフィロコッカス、ストレプトコッカス、百日咳菌およびエシェリキア・コリ毒素またはトキシイドを含むものである。

【0030】ワクチンを処方するための適当な担体媒体には、リン酸ナトリウム緩衝食塩水(pH 7.4)あるいはpH 6でリン酸ナトリウム緩衝食塩水中に懸濁された0.125Mリン酸アルミニウムゲルならびのその他の慣用の媒体が含まれる。ワクチンの使用に適当な他の医薬用担体も当業界で知られている。一般的に、約5〜約100 μ g、好ましくは約10〜50 μ gを含む本発明のワクチンが、若い恒温哺乳動物において莢膜ポリマーに対する有効なレベルの抗体を引き出すのに適当である。もちろん、正確な投与量は、定型的な投与量/応答実験によって決定されるであろう。連続的に与えられた数回の少ない投与量が単回注射として与えられた複合体の同じ量よりも優れたものであることが予想される。

【0031】本発明のワクチンは、任意の年齢の恒温哺乳動物中へ注射によって投与され得、そして特に、ヘモフィルス・インフルエンザb型、エシェリキア・コリ、肺炎球菌、髄膜炎菌、ストレプトコッカスおよびシュードモナス病原体によって引き起こされる若い哺乳動物における全身性感染に対する能動免疫化を誘導するために適用される。

【0032】

【発明の実施の態様】

【0033】

【実施例】

5. 実施例: PRP含有還元末端基の大きな、中ぐらいのおよび小さなフラグメントの生成ならびにCRM₁₉₇への複合

ヘモフィルス・インフルエンザb型の莢膜ポリマーは、繰返し単位[-3 β -D-リボシル(1 \rightarrow 1)リビトール(5-ホスフェート)-](PRP)を有する線状ポリマーである。一般に、PRPの酸加水分解は、全リボースの還元リボースに対する比が25ないしそれ以下に下降するまで行なわれる。得られたサイズ混合フラグメントは、複合のために、望まれるサイズ範囲のフラグメントを単離するために分子ふるいカラムクロマトグラフィーによって分画される。フラグメントを得るための方

法は以下の通りである。

- a. リボース28.6mgを含有するナトリウムPRP（核酸含量0.006%）の試料が、蒸留水で溶解されて125ml容三角フラスコにおいて全容量9.2mlとされ、そして水中で冷却された。
- b. 0.1N H_2SO_4 1.02mlが加えられた。
- c. 酸性化PRPの0.01mlの二重のサンプルが、氷上に保持された試験管へ移された（0分）。
- d. フラスコは沸騰水浴中へ3分間移され、そして次に

第 1 表

サンプル	還元リボースのナノモル（平均）	全リボース／還元リボース比
0分	0.42	493
3分	6.08	34.0
6分	9.66	21.4

結果（第1表参照）は、加水分解の単独モードが（1-1）グリコシド結合であったと仮定すると、6分後、数平均鎖長は21.4モノマー単位、すなわち（リビトール-5-ホスフェート-3-リボース）であることを示した。

- j. 1N NaOH 0.102mlが加えられ、そしてpHが指示紙によって評価された（約pH6）。
- k. 中和された加水分解物が凍結乾燥された。
- l. バイオ-ゲルP10 [Bio-Gel P10]（バイオラッドインコーポレーテッド [Bio-Rad Inc.] が0.1Mトリエチルアンモニウムアセテート中で平衡化され、そして直径1.5cmのクロマトグラフィーカラムに注がれ、98cmのゲル床高さを与えた。

第 2 表

含まれる プール	画分	全リボース マイクロモル	全リボース／ 還元リボース比	見積り* 分子数	画分の V_e/V_0 の範囲
L	15~18	577	31.2	11,000	≤ 1.08
M	19~23	744	18.6	6,800	1.09 ~ 1.38
S	24~34	1180	9.1	3,400	1.39 ~ 1.99

* 単独の加水分解はグリコシド的であるとの仮定の上でのものである。

【0036】p. 該プールは凍結乾燥され、水10mlで再水和され、再凍結乾燥され、そして水1.5mlで再水和された。最後の溶液1.2mlがマイクロ遠心分離管へ移され、そして複合反応のための調製物に凍結乾燥された。

PRPの還元フラグメントへのCRM₁₉₇の複合

- a. 凍結乾燥されたフラグメントL、MおよびSを含有するマイクロ遠心分離管ならびに空の遠心分離管（C

氷水浴中で冷却された。

- e. ステップcが繰返された（3分サンプル）。
- f. サンプルは、D-リボースで標準化されたアルカリ性ヘキサシアノ鉄(III)酸塩法によって還元力に関して検定された。
- g. この結果（第1表参照）に基づいて、ステップdが繰返された。
- f. ステップcが繰返された（6分サンプル）。
- i. ステップfが繰返された。

【0034】

m. 凍結乾燥化された物質（ステップk）は、水2.7mlで再水和され、そして1Mトリエチルアンモニウムアセテート0.3mlが加えられた。この溶液は該カラムへと適用されそして溶出が3.5ml画分の採取を行ないながら実行された。

n. リボシル残余物の溶出は、D-リボースを標準として用いるオルシノール反応によるリボース含量に関するそれぞれの画分の0.005mlサンプルの検定によって測定された。

o. 画分は、第2表に示されるようなL、MおよびSの3つのプール中へ合併され、そして該プールは全リボースおよび還元リボースに関して検定された。

【0035】

または対照）へ、リン酸カリウム緩衝液pH8、CRM₁₉₇ 2.7mgおよびナトリウムシアノボロハイドライド4mgが添加され、そして最終容量が0.2mlおよびリン酸緩衝液が0.2Mとなった。

- b. 該管は毎日混合しながら37℃でインキュベートされた。
- c. 18時間後に、該管は7000Gで2分間遠心分離された。

d. タンパク質の大部分が沈澱物中にあることが測定された後に、沈澱物は、1 ml 以下の水で4回洗浄された。

e. 洗浄された沈澱物は、尿素で8Mにされて、50℃にあためられ、食塩水に対して4℃で1晩透析され、そして遠心分離された。上澄み液は分離されそして硫酸アンモニウムで95%飽和したものとされ、4℃で1晩保たれ、そして遠心分離された。得られた沈澱物は、95%飽和硫酸アンモニウム0.4 ml で3回洗浄され、そして水1 ml に懸濁された。これらのコロイド状懸濁液は、それぞれCRM₁₉₇ - PRP - L、CRM₁₉₇ -

PRP - M、CRM₁₉₇ - PRP - SおよびCRM₁₉₇ - Cとラベルされた。

f. 該調製物は、ウシアルブミンを標準として用いるフォリンフェノール反応によってタンパク質に関して、またD - リボースを標準として用いるオルシノール反応によってリボシル残基に関して検定された。結果を第4表に示す。該調製物は、PRP抗原活性に関して、ヒト抗PRP抗体への標識された天然のPRPの結合を阻止するそれらの能力(50 μgタンパク質/mlの濃度において)によって検定された(第3表)。

【0037】

第 3 表

試験された 調製物	結合した 抗原の%	抗原活性 (ng PRP 調製物当量/ μgタンパク質)
なし	28.1	—
>天然のPRP 0.5ng/ ml	6.7	—
>天然のPRP 5ng/ ml	0.94	—
CRM ₁₉₇ - C	34.3	0.0
CRM ₁₉₇ - PRP - S	2.0	0.1
CRM ₁₉₇ - PRP - M	2.5	0.08
CRM ₁₉₇ - PRP - L	3.9	0.006

このようにCRM₁₉₇ がPRPフラグメントの不存在下でシアノボロハイドライドにさらされた対照調製物が予想通りに不活性であったのに対し、PRPフラグメントとのCRM₁₉₇ の複合体の試験されたすべてのものは、抗原性的に活性であった。

【0038】調製物は、高分子量精製PRPと比較して、ウサギにおける免疫原性に関し検定され、そして結果は第4表に示される。PRP対照またはCRM₁₉₇ - C対照を与えられたウサギは、抗PRP抗体におけるか

らうじて検知できる増加をもたらした。3種のCRM₁₉₇ - PRP複合体のいずれかを与えられたウサギは、それぞれの注射の後に進行性の増加をもたらし、3度回の注射の後の力価は、免疫化前よりも1000倍も大きなものであった。示されていない実験において、CRM₁₉₇ とPRPフラグメント調製物Lの単なる混合物がウサギにおいて検定され、そして抗PRP抗体を誘導しないことが見出された。

【0039】

第 4 表

通常のジフテリアトキソイドで予め処置された離乳ウサギ* の
複合されたおよび対照のワクチンに対する抗PRP抗体応答

ウサギワクチン**	ペントース/ タンパク質比率	抗PRP抗体 ng/ml, 週齢			
		7***	8***	9***	10
1. PRP (MW10 ⁶)		<10	12	28	40
2. "		<10	<10	27	26
3. CRM ₁₉₇ - C (対照)	—	35	25	31	38
4. "		18	34	40	48
5. CRM ₁₉₇ - PRP - S	0.015	19	880	26,000	48,000
6. "		<10	84	23,000	31,000
7. CRM ₁₉₇ - PRP - M	0.0089	<10	37	2,500	11,000
8. "		23	11,000	49,000	150,000
9. CRM ₁₉₇ - PRP - L	0.0020	14	73	3,700	28,000
10. "		<10	340	9,800	76,000

* ウサギは、離乳直後にダッチランドファームス [Dutchland Farms] から得られたニュージーランドホワイト [New Zealand White] であった。それぞれの第6週齢で 0.0125 Mリン酸アルミニウムpH6 (ミョウバン) の 0.5ml 中に含有されたジフテリアトキソイド (マサチューセッツデパートメントオブパブリックヘルス [Massachusetts Dept. of Public Health] 40Lf を皮下注射された。

** PRPワクチンは食塩水 0.1ml 中に含まれた30μg PRP ロット17であった。他のワクチンは 0.5ml ミョウバン中に含まれたタンパク質25μg であった。

*** 示されたワクチンの注射が放血直後に皮下になされた。1 ワクチン当り 2 匹のウサギを用いた。列挙されたものは、³H 標識化天然 PRP と結合する放射線抗原により測定された、それぞれの力価である。

【0040】複合体によって誘導された抗PRP抗体の防御能は、第4表のウサギ血清の殺菌活性を試験することによって評価された。殺菌価は、アンダーソンら、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション 第65巻、第 885～891頁 (1980年) [Anderson et al. Journal of Clinical Investigation, Volume 65, pages 885-891 (1980)] の方法によってヘモフィルス・インフルエンザb株Eag [H. Influenzae b strain Eag]

に対して測定された。第5表は、予防接種前は、血清は細菌を殺すことができないものであった (逆数力価<2) ことを示す。3回の注射の後、CRM₁₉₇ - PRP 複合体を与えられたウサギの逆数力価は16ないしそれ以上に上昇したが、一方CRM₁₉₇ 対照を与えられたウサギの力価は2にとどまった。

【0041】

第 5 表

CRM₁₉₇、またはPRPのオリゴ糖S、MおよびLとのCRM₁₉₇の複合体で予防接種* された離乳ウサギの血清のヘモフィルス・インフルエンザb株Eagに対する細菌価

ウサギ	与えられたワクチン	90%を超える殺菌のための 血清希釈の逆数	
		予防 接種前	3回 注射後
3	CRM ₁₉₇ 対照	<2	<2
4	CRM ₁₉₇ 対照	<2	<2
5	CRM ₁₉₇ - PRP - S	<2	128
6	CRM ₁₉₇ - PRP - S	<2	≥256
7	CRM ₁₉₇ - PRP - M	<2	16
8	CRM ₁₉₇ - PRP - M	<2	64

9	CRM ₁₉₇ - PRP - L	< 2	64
10	CRM ₁₉₇ - PRP - L	< 2	32

*第4表において述べたものと同様の予防接種。

6. 実施例：CRM₁₉₇ に対するPRPフラグメント比の変化

この実施例において、CRM₁₉₇ に対するPRPフラグメントSの比率は変えられ、そしてCRM₁₉₇ 成分の抗原活性の維持がPRP成分への添加において調べられた。

CRM₁₉₇ - PRP - S #2のAおよびBの調製

a. マイクロ遠心分離管AおよびBに、上記で述べた（すなわちステップoおよびp）フラグメントSの溶液0.15mlがそれぞれ加えられた。該溶液は凍結乾燥された。

b. 管Aは、2Mリン酸カリウム緩衝液pH8の0.015ml、0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7中の5mg/mlのCRM₁₉₇ の0.1ml、および200mg/mlナトリウムシアノボロハイドライドの0.015mlを与えられた。

c. 管Bは該pH8の緩衝液0.002mlおよび該CRM₁₉₇ 溶液0.1mlを与えられた。得られた溶液は凍結乾燥された。この固体は、水0.015mlで懸濁され、そして該pH8の緩衝液0.002mlが加えられた。

d. 管AおよびBは37℃で13日間インキュベートされた。管Bに対してシアノボロハイドライド0.002mlがさらに添加された。双方の管は、37℃でさらに3日間インキュベートされた。（減少した反応容量によって、Bにおける反応体の濃度はAのものよりも高くなったことを示す。）

e. Aに、水0.06mlおよび飽和硫酸アンモニウム（SAS）0.8mlが加えられた。Bには、水0.175mlおよびSAS0.8mlが加えられた。

f. 該管は、0℃で1時間インキュベートされ、そして

て8000Gで20分間遠心分離された。上澄み液が除去された。

g. 沈澱物は、80% SAS 1ml中への懸濁、8000Gで20分間の遠心分離そして上澄み液の除去によって洗浄された。

h. 沈澱物は、水0.1mlで懸濁され、そしてSAS0.4mlが添加された。

i. ステップfと同じ。

j. ステップgと同じ。

k. Bにおける沈澱物は、9.5M尿素0.084mlで溶解され（最終濃度は8Mと見積られた。）、水0.1mlおよびSAS0.8mlが添加され、そして沈澱物がステップfにおけるようにして単離された。この沈澱物はステップgにおけるようにして洗浄された。

l. AおよびBにおける沈澱物は、水0.2mlで懸濁された。懸濁液は8000Gで30分間の遠心分離によって可溶性（s）画分および不溶性（i）画分へ分離され、そしてs画分（上澄み液）は、0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液pHとされそして貯蔵された。

m. i画分（沈澱物）は、以下のようにより可溶性にされた：i画分は尿素で8Mとされ、そしてこれは0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7に対しての透析によって段階的に除去された。得られた溶液はそれぞれのs画分と再び合わせた。

n. 調製物AおよびBは、フォリンフェノール試薬でタンパク質含量に関して、また上記した検定法によってPRP抗原活性に関して試験された。以下に示すように、双方ともPRP活性を有するが、BはAよりも約13倍優れていた。

【0042】

調製物	ngPRP当量/ μ gタンパク質
CRM ₁₉₇ - PRP - S #2, A	0.038
CRM ₁₉₇ - PRP - S #2, B	0.50

o. 調製物AおよびBは、マサチューセッツ デパートメント オブ パブリック ヘルスによって供給された精製ジフテリアトキソイドのサンプルへの抗体の結合の阻止によってCRM抗原性（ジフテリアトキソイド

試験された
インヒビター

なし

DT, 0.5 μ g/ml

DT, 5 μ g/ml

DT, 50 μ g/ml

CRM₁₉₇ - PRP - S #2, A, 50 μ g/ml

結合した抗体, タンパク質1 μ g
A₄₀₀ 当りの μ gDT当量

2.43

2.56

1.93

0.96

1.25 0.52

（DT）としての活性）に関して試験された。以下に示すように、双方とも、重量にもとづいた場合、概ねDTと等しい活性を有するが、BはAよりも約4倍近く優れていた。

CRM₁₉₇-PRP-S #2,B, 5 μ g/ml
 p. 調製物AおよびBは、16 μ gタンパク質1mlでミョウバン中に懸濁され、そして第4表に述べられた処方(しかしながら動物は、着手時に8週齢であり、またジフテリアトキソイドの予めの注射によって前処理されていなかった。)において、3回の0.5ml注射がウサギに与えられた。血清はステップoに記載の結合検定法において抗体に関して試験された。AおよびBの

1. 67

2. 0

双方とも、第6表に示すように、DTに対するならびにPRPに対する抗体を誘導するものであった。別個の対照実験は、CRM₁₉₇ 調製物で注射されない状態において同じ宿舎の同様のウサギが抗DT抗体価におけるこのような増加が発現しなかったことを示した。

【0043】

第 6 表

ウサギ	注射物	表示物に対する抗体 に関する検定	週齢での抗体価			
			8週	9週	10週	11週
5	A	PRP, ng/ml	47	60	210	13,500
		DT, A ₄₀₀	0.136	0.168	1.28	3.81
6	A	PRP	21	25	19	420
		DT	0.072	0.049	0.262	3.23
7	A	PRP	< 20	20	2000	10,500
		DT	0.155	0.134	0.155	0.676
3	B	PRP	< 20	27	1600	4900
		DT	0.075	0.061	0.227	2.45
8	B	PRP	23	< 20	2900	26,000
		DT	0.065	0.023	0.231	2.07

7. 実施例: PRPの非常に小さなフラグメントのジフテリア毒素、ジフテリアトキソイドおよびCRM₁₉₇ への複合
還元末端基を有するPRPの非常に小さなフラグメントの生成

- PRPロット20の溶液12mlが、0℃でHC1で0.1Mとされ、ガラス製フラスコ中に封じ込められた(0分)。
- 該フラスコは沸騰水浴中に4分間移され、次に氷水浴中に冷やされた。
- 少量の生成した白色のコロイドは、エーテルでの抽出によって除去され、得られた透明な溶液は凍結乾燥された。
- バイオ-ゲルP10(バイオ ラッド インコーポレーテッド)は0.01M酢酸アンモニウム中で平衡化され、そして直径1.5cmのクロマトグラフィーカラム中に注がれ、98cmのゲル床高さを与えた。
- 凍結乾燥された物質は水1.5mlで再水和されそしてNH₄OHで中和された。この溶液が該カラムにかけられ、溶出が行なわれた。
- 2.0~2.4のV_e/V_o比で溶出するフラグメントが集められ、画分vsと命名された。
- 画分vsの供給を二倍とするために、a~fのステップが繰返された。
- 合わせた画分vsは、D-リボースで標準化されたアルカリ性ヘキサシアノ鉄(III)酸塩法によって検定された場合に総計47 μ molの還元糖活性を含む4mlの溶液を得るために、凍結乾燥され再水和された。

PRP-vsフラグメントの天然ジフテリア毒素、天然ジフテリアトキソイドおよびCRM₁₉₇ との複合体の調製

以下のタンパク質は、本実施例において担体として用いられる。

(1) DTx-精製ジフテリア毒素、ロット1
 マサチューセッツ パブリックヘルス バイオロジック ラボラトリーズ [Massachusetts Public Health Biologic Laboratories] から得られた。部分的脱毒性化がPRPvsへの結合によって行なわれる。残留毒性はパペンヘイマーら、イムノケミストリー、9: 891 (1972年) [Pappenheimer et al., Immunochem. 9: 891 (1972)] の方法によってリシンの存在下におけるホルマリン処理によって除去される。

(2) DTd-慣用の(正式な)トキソイド、ロットDCP-27

上記マサチューセッツ ラボラトリーズ よりまた得られた。

(3) CRM₁₉₇-毒素タンパク質の抗原性的に変異されたバージョン毒素と抗原性的に同一であるが非毒性である。

【0044】複合方法は以下の通りである。

a. タンパク質、リン酸カリウム緩衝液(25℃でpH8.0)およびPRPvsが、次に示す様式においてガラス製遠心分離管中で合わされた。

溶液	タンパク質	緩衝液	PRPvs
(1)	30mg DTx	0.24 μ mol	20 μ mol
(2)	30mg DTd	0.24 μ mol	20 μ mol

- (3) 10mg CRM₁₉₇ 0.08μmol 6.7μmol
 b. 溶液は凍結乾燥され、そして凍結乾燥物は、以下に表として示されるように、2%w/v NaCNBH₃水溶液で溶解された。

【0045】

溶 液	2% NaCNBH ₃
(1)	1. 2ml
(2)	1. 2ml
(3)	0. 4ml

- c. 該管は37℃でインキュベートされた。
 d. 14日後に、飽和硫酸アンモニウムの4容量当量が添加された。これらの懸濁液は0℃で3時間保たれ、次に9000Gで20分間遠心分離された。
 e. 沈澱物は、中性の70%飽和硫酸アンモニウム10mlをそれぞれ用いて2回洗浄された。
 f. 洗浄された沈澱物は、9.5M尿素の最小の容量で溶解され、そして0.067Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7.8に対して透析された。

【0046】複合体のホルマリン処理

- a. 複合体はさらに0.025Mリシンをまた含むものであるリン酸ナトリウム緩衝液に対してさらに透析された。(少量のサンプルが、ホルマリン化の前に毒性試験のために取って置かれた。)
 b. ホルマリンが0.2%v/vの最終濃度まで添加された。
 c. 約24℃で17日間のインキュベーションの後、溶液は、リン酸ナトリウム緩衝液に対して広範に透析された。
 d. 遠心分離が少量の不溶性物質を除去するために行われた。

【0047】最終的容器製品を得るための手順

- a. 等張性リン酸ナトリウム緩衝液における抗原溶液(1)～(3)は、0.22ミクロン「ミレックス [Millex]」フィルターユニット(ミリポア コーポレーション [Millipore Corp.])を通過させられ、そして滅菌リン酸緩衝食塩水を含有する瓶中に注入された。
 b. 調製物はローリー法 [Lowry method] を用いてタンパク質に関して検定された。
 c. チメロサールが過剰されてそして新たに作られた1%w/v 溶液の1/100容量となるように溶液中に注入された。10mlのサンプルが殺菌試験のために取られた。瓶が、手動の滅菌単回使用充填具(マルチプル アディティブセット, Travenol Laboratories)へ取付けられた。2mlガラス瓶が満たされ、栓をされ、密封され、そして4℃で貯蔵するために迅速に移された。

【0048】複合体調製物における検定

- a. タンパク質画分のホスフェート含量

PRPはリボシル-リビトール-ホスフェートの繰返し単位から構成される。これゆえに、5%トリクロロ酢酸(TCA)によって沈澱可能な画分におけるホスフェートの比色検定は、タンパク質中のPRPフラグメントの取り込みの敏感な指針である。タンパク質100μgを含有するサンプルが3mlの容量においてTCA5%に作成され、氷上に20分間保持され、そして4℃において2000×gで15分間遠心分離された。沈澱物は、5%TCAの別の3mlで洗浄され、次にエタノール5mlで洗浄された。洗浄された沈澱物は、有機ホスフェートを無機ホスフェート(Pi)に変換するために灰化され、そして該Piは、チェンら, アナル. ケム., 28:1756(1956年) [Chen et al., Anal. Chem., 28:1756(1956)]の方法によって定量された。結果は以下の通りである。

【0049】

サンプル	n mol Pi/ μgタンパク質	PRP 繰返し単位/ タンパク質の 暗示平均数
(1)DTx-PRPvs	0. 11	6. 8
(2)DTd-PRPvs	0. 10	6. 2
(3)CRM ₁₉₇ -PRPvs	0. 10	6. 2

b. 電気泳動的分析

複合抗原のサンプルが、メルカプトエタノール-ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ME-SDS-PAGE)により、それぞれの出発担体タンパク質調製物と並んで同じゲルにおいて分析された。

【0050】DTd-PRPvsは、DTdと同様に、分子量61,000ダルトンでの分散バンドを示した。これに対し、DTx-PRPvsおよびCRM₁₉₇-PRPvsは、出発タンパク質とはかなり異なるものであった。これら2つの複合体のタンパク質は、スタッキングゲル(4%アクリルアミド)の始めにもしくは中にあるいは分離ゲル(10%アクリルアミド)の始めに集められた。これゆえ、複合体は、恐らくホルマリン処理からの架橋結合による、高分子凝集体に転化していると思われる。DTd-PRPvsはまたいくらかの凝集した物質を含んでいる。

c. タンパク質1単位当りのPRP抗原当量

抗PRP抗体を結合するための複合体の能力が、PRPロット19で較正された、ヒト抗PRP抗血清による標識化PRP結合の阻止によって測定された。(タンパク質結合ポリマーフラグメントは、高分子量ポリマーに対する重量-当量形式において抗体に結合することが仮定できないゆえに、定量的化学組成はこれらのデータから推論され得ない。)

サンプル	の阻止%	μ gタンパク質
PBS 対照	(0)	—
PRP19, 0.5ng/ ml	6.7	—
PRP19, 5ng/ ml	32	—
PRP19, 50ng/ ml	90	—
DTx-PRPvs, 5 μ g タンパク質/ml	24	0.5
DTd-PRPvs, 5 μ g タンパク質/ml	48	2.2
CRM ₁₉₇ -PRPvs, 5 μ g タンパク質/ml	38	1.4

d. タンパク質1単位当りのジフテリアトキソイド抗原当量

抗DTd抗体と反応する調製物の能力の維持が、精製DTdが検定管(固相)に付着される酵素結合イムノソル

ベント検定法(ELISA)の阻止によって測定された。付着DTdへの抗体結合の阻止は、流体層において用いた同じDTdによって較正される。

【0051】

サンプル	抗体結合 の阻止%	μ g DTd当量/ μ gタンパク質
PBS 対照	(0)	—
DTd, 5 μ g タンパク質/ml	24	—
DTd, 50 μ g タンパク質/ml	50	—
DTx-PRPvs, 50 μ g タンパク質/ml	46	0.68
DTd-PRPvs, 50 μ g タンパク質/ml	58	2.1
CRM ₁₉₇ -PRPvs, 50 μ g タンパク質/ml	26	0.11

e. ジフテリア毒性活性

本来のDTxならびにホルマリン処理前および後の複合体DTx-PRPvsが、非免疫成体ウサギの皮膚中への注射によって毒性活性に関し力価評価された。0.002 μ gおよび0.02 μ gの投与量で、DTxは予期された皮膚病変をもたらした。ホルマリン処理前のDTx-PRPvsは0.2 μ gがDTx 0.002 μ gとほぼ等しい(複合による毒性における100倍の低減)というような投与量依存性病変をもたらした。ホルマリン処理の後、病変は2 μ g程も高い投与量によっても発生しなかった(DTxと比較して少なくとも1000倍の低減)。複合体DTd-PRPvsおよびCRM₁₉₇-PRPvsの最高2 μ gまでの投与量が同様に試験されたが、病変は発生しなかった。

f. 放射線抗原結合により計測された、離乳ウサギにおける抗PRP抗体応答の誘導

抗原は、リン酸アルミニウムアジュバンド(0.0125M Al, pH6)と混合され、0.5ml投与量がタンパク質25 μ gを含むようにされた。2匹のウサギ(それぞれの抗原に関して)は第7週齢で始められる3回の週間注射を与えられたが、該ウサギは仮定の「担体初回免疫[carrier priming]」効果のために第5週齢でDTdのみでの注射をされていた。すべての動物(ウサギ1~7)は3回目の予防接種の後に、少なくとも1

0 μ g/mlの力価を有して、既往パターンにおける抗PRP上昇を有した。抗原CRM₁₉₇-PRPvs、およびDTd-PRPvsは、DTdで「初回免疫され」ていなかった2匹のウサギにおいてさらに試験された。これら(ウサギ7~10)は「初回免疫された」ウサギにおけるものと同様な強力な抗PRP応答を起こした。

g. ELISAによって計測された、離乳ウサギにおける抗DTd抗体応答の誘導

前述の分節の同様の「初回免疫されていなかった」ウサギ(7~10)の抗DTd抗体応答は次の通りである：上昇は2回目の注射の後概ね10倍および3回目の注射の後さらに2~5倍であった。

h. サンプル調製物の生殖不能

サンプルは、増殖培地としてフルイド チオグリコレート[Fluid Thioglycollate](ビービーエル カタログ ナンバー 11260, ロットD4D LKL [BBL cat. no. 11260, lot D4D LKL])を用いて測定された場合生殖不能であることが見出された。

【0052】8. 実施例：幼児におけるワクチンとしてのジフテリアトキソイドおよびCRM₁₉₇に複合したPRPフラグメントの使用

1~2才の年齢範囲の8人の幼児の2つのグループ、(および第18カ月齢でジフテリアトキソイドタンパク質での定型的予防接種を受ける特に免除される幼児)

は、以下のように最初のおよび第2回目の予防接種を受けた。グループIは、前述の節において述べるように調製されたCRM₁₉₇-PRPvsの注射を受け（食塩水中にタンパク質25 μ g、皮下的）、グループIIは、前述の節において述べるように調製されたDTd-PRPvsの注射を受けた（食塩水中にタンパク質25 μ g、皮下的）。

【0053】最初の臨検においては、予防接種前血液標本が採取され、幼児が予防接種され、次にアナフィラキシー反応の徴候に関して20分間観察された。第2の臨検においては、第1の臨検における手順が繰返された。第3の臨検においては、2回目以降の血液標本が採取された。それぞれのグループからひとりの、2人の幼児は、親との相談の後に、PRPに対する抗体を防御レベ

ルへ高めることを試みるために第3回目の予防接種を与えられた。予防接種の間の間隔は1 \pm 1/2 カ月であった。

【0054】グループIIIは、別の部位でのジフテリアトキソイドタンパク質と同時にワクチンを受ける約18カ月齢の幼児から構成された。このグループは、一方がCRM₁₉₇-PRPvsワクチンを受け、他方がDTd-PRPvsワクチンを受ける2人の幼児を含むものであった。徴候が体温の測定、全身性疾患の挙動指示の表記、および注射部位での炎症の観察によって、連続する4日の間記録された。これらの徴候は第7表に要約される。

【0055】

第 7 表
PRPvsのCRM₁₉₇ および正式
ジフテリアトキソイドへの複合体に対する副反応

ワクチン	徴 候	注 射		
		初 回	2回目	3回目
CRM ₁₉₇ -PRPvs	熱	1/8	0/8	0/1
	正常でない挙動	0/8	0/8	0/1
	局部的炎症	1/9 *	2/9	0/1
	局部的痛み	1/9 *	1/9	0/1
DTd-PRPvs	熱	0/8	0/8	0/1
	正常でない挙動	0/8	0/8	0/1
	局部的炎症	1/9 *	0/9	0/1
	局部的痛み	1/9 *	0/9	0/1

* 同時に別の部位でのジフテリアトキソイドタンパク質を受けたひとりの幼児を含むものである。局部的徴候は見られなかった。全身性徴候は、ジフテリアトキソイドタンパク質ワクチンの効果と区別することができないゆえに書留められない。

【0056】CRM₁₉₇-PRPvs予防接種後、ひとりの幼児が初回予防接種の後に、軽い熱（99.8°F）を有し、またそれぞれ初回の1つ、2回目の1つおよび3回目の1つの予防接種の直後に軽い局部的炎症の例があった。DTd-PRPvs予防接種後、初回の1つ、2回目の1つの予防接種の直後に局部的炎症の例があった。該ワクチンの投与は、他の点では副反応のないものであるらしかった。

【0057】血清抗体応答

PRPに対する抗体ならびにジフテリアトキソイドに対するIgG抗体が測定された。CRM₁₉₇-PRPvsでの予防接種後、一貫した抗PRP応答パターンが見られた。第8表を参照のこと。初回の注射の後にはっきりとした上昇が、2回目の注射の後に通常わずかにより大きな上昇が、そして1つの3回目の注射の後に大きな上昇があった。最終的力価は、PRPのみでの予防接種によってもたらされるものをかなり超えた、および0.15 μ g/mlの許容される見積り防御最小レベルをかなり

超えたものであった。高められた応答は、PRPのみに対する応答が防御に関し通常不十分である18カ月齢未満の4人の幼児において特に明白であり、そしてこれらの4人における最終力価の重量平均（8.4 μ g/ml）は、PRPワクチンのみでの12～17カ月齢幼児の予防接種後に見られるものの175倍である。ジフテリアトキソイドタンパク質での同時に初回予防接種を受けた幼児はまた優れた応答を有した。

【0058】ジフテリアトキソイドに対するIgG抗体は、8人の幼児のうち6人（ならびに、処置の一部としてジフテリアトキソイドをまた受けた第9番目の幼児）において増加した。該抗体レベルは、しばしば非常に大きく増加したので、用いられた予防接種後の血清の希釈（1/1000）は、上昇の最大範囲を示すのに不十分なものとなった。

【0059】DTd-PRPvsでの予防接種後、抗PRP応答は、一般的に初回および2回目の双方の予防接種後に増加した。（第9表参照）。しかしながら、全く応

答が検知されなかった2人の幼児(12カ月齢および14カ月齢)があり、そしてひとりの幼児は、3回目の注射が与えられるまで防御的レベルに近づかなかった。ジフテリアトキソイドタンパク質での同時的な初回予防接

種を受ける幼児は優れた応答を有した。ジフテリア成分に対するIgG抗体における上昇はすべての幼児において見られた。

【0060】

第 8 表

CRM ₁₁₉ - PRPvsに対する抗体応答				
被実験者	初回予防接種時の年齢	血清サンプル	血清抗体 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
			抗PRP	IgG抗DTd
1	12カ月齢	予防接種前	2.0	1.1
		1回目後	4.5	>10
		2回目後	18	>10
2	13カ月齢	予防接種前	<0.006	0.38
		1回目後	0.040	1.7
		2回目後	0.35	2.2
		3回目後	4.8	1.9
3	14カ月齢	予防接種前	<0.020	4.5
		1回目後	0.12	3.3
		2回目後	2.0	4.3
4	16カ月齢	予防接種前	0.025	0.06
		1回目後	0.92	5.7
		2回目後	29	9.1
5	27カ月齢	予防接種前	0.025	3.0
		1回目後	10	>10
		2回目後	58	>10
6	29カ月齢	予防接種前	0.13	6.1
		1回目後	22	6.9
		2回目後	180	7.4
7	30カ月齢	予防接種前	2.2	6.5
		1回目後	28	>10
		2回目後	50	>10
8	30カ月齢	予防接種前	1.3	4.8
		1回目後	6.5	10
		2回目後	78	10
9	18カ月齢*	予防接種前	0.34	3.1
		1回目後	1.4	>10
		2回目後	8.2	>10

* CRM₁₁₉ - PRPvsの初回注射が、別の部位におけるジフテリアトキソイドタンパク質ワクチンと同時に与えられた。

【0061】

第 9 表

DTd - PRPvsに対する抗体応答				
被験者	初回予防接種 時の年齢	血清サンプル	血清抗体 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
			抗PRP	IgG抗DTd
1	12カ月齢	予防接種前	<0.020	0.060
		1回目後	<0.020	10
		2回目後	<0.020	10
2	12カ月齢	予防接種前	0.055	0.03
		1回目後	0.080	3.1
		2回目後	1.8	10
3	13カ月齢	予防接種前	<0.006	1.1
		1回目後	<0.006	10
		2回目後	0.023	10
		3回目後	0.120	10
4	14カ月齢	予防接種前	<0.020	3.0
		1回目後	<0.020	5.1
		2回目後	<0.020	3.8
5	19カ月齢	予防接種前	0.060	8.0
		1回目後	0.12	10
		2回目後	0.76	10
6	26カ月齢	予防接種前	<0.020	6.9
		1回目後	0.060	10
		2回目後	0.94	10
7	27カ月齢	予防接種前	1.4	6.1
		1回目後	7.4	10
		2回目後	21	10
8	28カ月齢	予防接種前	<0.020	8.7
		1回目後	0.63	10
		2回目後	8.0	10
9	18カ月齢*	予防接種前	1.9	0.11
		1回目後	2.9	10
		2回目後	11	10

* DTd - PRPvsの初回注射が、別の部位におけるジフテリアトキソイドタンパク質ワクセンと同時に与えられた。

【0062】この実施例は、ヘモフィルス・インフルエンザ b型莢膜ポリマーフラグメントのジフテリアトキソイドおよびCRM₁₉₇ への複合体の注射は危険性のないものらしいことを示すものである。CRM₁₉₇ - PRPvs予防接種は、高い力価によるもののみならず2回目の予防接種の後の上昇により察知される、担体効果による抗PRP応答の高まりを明白に示すものである。

【0063】DTd - PRPvsは印象のより薄い高まりを有した。有望な説明は、CRM₁₉₇ - PRPvsが多分子凝集であるのに対し、DTd - PRPvsは、もとのトキソイドと類似の単一分子形態において主に存在するということである。

9. 実施例：ストレプトコッカス・ニューモニエの莢膜ポリマーフラグメントのCRM₁₉₇への複合

いくつかの他の細菌は、これらが敗血症および髄膜炎を引き起こす、特に乳児において引き起こすことにおいて、これらが、それに対する抗体が防御的である莢膜ポリマーを有することにおいて、そしてこれらの莢膜ポリマーが成熟したヒトにおいては免疫原性であるが乳児において免疫原性でないことにおいて、ヘモフィルス・インフルエンザbと類似している。その重要な一例はストレプトコッカス・ニューモニエ (Sp) 血清型6 [Streptococcus pneumoniae (Sp) serotype 6] である。こ

れは上述したような生命を脅かす感染を引き起こすのみならず、幼児における中耳炎のかなり有力な原因である。(グレイら、ジャーナル オブ インフェクシャス ディジーズ、第142巻、第923～933頁、1980年 [Gray et al., Journal of Infectious Diseases, Volume 142, pages923-33, 1980])。

【0064】PRPに関して述べられたアプローチがまた、抗原特異性を維持しつつ、選択的加水分解により還元基を生成され得る任意の莢膜ポリマーに対して適用可能である。以下の非限定的実施例においては、莢膜ポリマーフラグメントは、選択的酸加水分解によってSp. 6 (ストレプトコッカス・ニューモニエ 血清型6) から生成され、そしてCRM₁₉₇ へ複合された。該製品はSp莢膜ポリマーおよびCRM₁₉₇ 成分の双方に関する抗原特異性を維持していた。

【0065】莢膜ポリマー (CP) からの還元フラグメントの生成

1. Sp. 6のCPのサンプル (ダニッシュ タイプ6A, イーライ リリー カンパニー [Danish type 6A, Eli Lilly Co.]) が、D-グルコースで標準化されたフェノール-硫酸法によって全ヘキサースに關して、およびD-グルコースでまた標準化されたアルカリ性ヘキサシアノ鉄 (III) 酸塩法によって還元能に關し

て検定された。

2. パイレックス管が、水0.66mlで溶解されたSp.6CP 3.3mgを与えられた。このサンプルは0℃に冷やされ、0.1N HCl 0.073mlが加えられ、そして該管は密封された。

CP
Sp.6 100℃で加熱された時間
0分
10分

4. 加水分解された調製物（検定に用いられた2%を除く）は凍結乾燥された。乾燥物は、水0.1mlで溶解され、マイクロ遠心分離管に移され、そして再度凍結乾燥された。

【0067】CRM₁₉₇への複合

1. 再乾燥された加水分解物に、2Mリン酸カリウム緩衝液pH8の0.004ml、および0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7の0.2ml中に溶解されたCRM₁₉₇の1mgが加えられた。得られた混合物は、凍結乾燥され、そして水0.05mlで再懸濁された（見積り全容量0.063ml）。

2. 該管に、200mg/mlナトリウムシアノボロハイドライド0.007mlが加えられ、そして該調製物は37℃で18日間インキュベートされた。

3. 80%飽和硫酸アンモニウム（SAS）0.6mlが添加された。

4. 該管は0℃で1時間インキュベートされ、そして8000Gで15分間遠心分離された。上澄み液が除去された。

5. 沈澱物は、0.01Mリン酸ナトリウムでpH8に緩衝された80%SAS0.6ml中への懸濁、およびこれに続く8000Gで15分間の遠心分離によって洗浄された。

6. 沈澱物は0.5M Na₂HPO₄ 0.02

3. 該管は沸騰水浴中へ10分間浸され、次に0℃に再び冷やされた。少量のサンプルがステップ1で述べられるような還元能に関して検定された。

【0066】

全ヘキソース/
還元ヘキソース
>350
6.5

mlおよび9.5M尿素0.2mlで懸濁された。

7. SAS1mlが加えられ、沈澱物がステップ4と同様にして単離されそしてステップ6と同様にして約8Mで尿素中に懸濁された。

8. 懸濁液は8000Gで15分間遠心分離された。

9. 上澄み液は分離されそして0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7に対して4℃で透析された。

10. CRM₁₉₇-Sp.6と呼称される、この透析された調製物は以下に関して、検定された。

ーフォリン フェノール反応によりタンパク質

ー放射線標識されたSp CPへの抗体の結合の阻止によりSp抗原性（第3表においてPRPに関して述べたものと同様）

ージフテリアトキソイド（DT）への抗体結合の阻止によりCRM₁₉₇抗原性（CRM₁₉₇-PRP-S#2の記載のステップoにおいて述べたものと同様）、ならびに

ージフテリアトキソイド（DT）への抗体結合の阻止により抗CP免疫原性に関して（CRM₁₉₇-PRP-S#2の記載のステップpにおいて述べたものと同様）。第7表を参照のこと。

【0068】

調製物	ngCP当量/ μgタンパク質	μgDT当量/ μgタンパク質
CRM ₁₉₇ -Sp.6	0.4	0.36

第10表

対照およびCRM₁₉₇と

ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型6

フラグメントとの複合体による離乳ウサギの抗CP免疫原性応答

ウサギ	予防接種物*	年齢でのサンプルにおいて結合した ¹⁴ C-CPのパーセント**			
		6週齢	8週齢	10週齢	11週齢
1	Sp6 CP, 25μg	6	6	7	7
2	"	6	13	13	11
3	Sp6 細菌, 25μg	4	10	12	16
4	"	8	12	22	21
5	CRM ₁₉₇ -Sp6, 25μg	4	6	30	49
6	"	4	8	30	54

* 血清サンプルを採取する直前に皮下的に注射された。血清サンプルは第6, 8

および10週齢で採取された。

**血清25 μ lが 14 C-標識化CRM 2nCiとインキュベートされた。

10. 実施例：CRM₁₉₇に対する酸化開裂により產生するPRPフラグメントの複合

本実施例では、最終複合体は、2成分よりなる。すなわち、非毒性の免疫原性ジフテリア毒素CRM₁₉₇に共有結合してよく定義された鎖長のPRPのフラグメント類である。本実施例では、過ヨウ素酸塩酸化および限外濾過による単離の条件は莢膜ポリマー（PRP）フラグメント類の鎖長をコントロールする。

【0069】複合体は、フラグメントの両端にアルデヒド基を有する莢膜ポリマーフラグメントより構成され

タンパク質含量	<1.0%
核酸含量	\leq 1.0%
エンドトキシン (LAL)	<1.0 EU/ μ g PRP
分子サイズ (Kd)	<0.3 (CL-48)
	<0.6 (CL-28)

PRPフラグメントの產生方法

- PRP (5~7 mg/ml) の溶液を4℃に冷却し、かつ2Mのリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を添加して最終濃度を0.2Mのリン酸塩とした。
- メタ過ヨウ素酸ナトリウム (0.2~0.3 mol I₂O₄ / mol PRP) を急速に混合しながら添加し、この溶液を暗所に一夜4℃でインキュベートした。
- 反応溶液をH1P30中空糸 (アミコン, 30, 000 Mwカットオフ) を用いて限外濾過した。保持物を250 mlの食塩水で4回洗浄した。濾液を合わせ、H1P10中空糸 (アミコン, 10, 000 Mwカットオフ) を用いて限外濾過した。保持物を250 mlの食塩水で4回洗浄した。ついで保持物をml当りPRP 35 mg以上に濃縮した。

	糖 鎖 長			
画分番号	画分のDP		合計%	
	バッチ#2	バッチ#3	バッチ#2	バッチ#3
14	36.5	41.0	12.7	5.9
15	24.1	32.5	11.0	9.4
16	25.3	24.5	13.2	11.8
17	25.4	22.8	14.4	14.3
18	23.2	20.2	13.6	14.6
19	20.2	19.0	11.9	14.2
20	20.4	17.7	9.3	12.4
21	16.1	16.0	6.7	10.0
22	11.7	12.3	7.2	7.1

CRM-PRP複合

- CRMタンパク質を、0.2Mのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、最終濃度100 mg/mlとした。
- 凍結乾燥したオリゴ糖類を蒸留水中で再構成し、適量 (平均DP 20) をCRMタンパク質に添加

る。かくして、各フラグメントは、両端において、恐らくCRMのリジン残基においてCRMと共有結合し得る。かくして、産生物の構造は、「格子」と考えられる。複合体の組成および恐らく構造は、複合の化学反応において2成分の濃度を変えることにより変えることができる。

【0070】PRP-CRM複合体ワクチン用のPRPフラグメント產生するために使用されるPRPは、つぎの仕様を有している。

- 保持物をオルシノール検定によりリボースを、またアルカリ性フェリシアン化物検定により還元性を分析した。少量の保持物を、溶出液として0.15Mの食塩水を用い、かつオルシノールおよびアルカリ性フェリシアン化物検定による画分のそれぞれを分析することによりバイオゲル (Biogel) P-100カラム (0.7×25 cm) 上で分析した。分析結果は、保持物質が重量平均DP約20でDP 15~30を有する多糖類よりなることを示した。

【0071】酸化開裂よりつくられた莢膜ポリマーフラグメントについては、鎖長 (DP) は (リボース単位/還元基) × 2として定義される。過ヨウ素酸で酸化されたPRPの二つのバッチは、d項と同様に分画され、かつ下記のように特徴づけられる。

し、かつ溶液を混合した。

- ナトリウムシアノボロハイドライド (0.5 g/ml) (10×モル過剰) を添加し、溶液を混合し、37℃で3日間インキュベートした。
- ナトリウムボロハイドライド (100×還元基) を添加し、かつこの溶液を室温で2時間放置した。

e. 複合体を10倍の6Mの尿素で希釈して沈澱を溶解し、この溶液をYM-30(30,000Mwカットオフ)膜を有するアミコン攪拌セルを用いて限外濾過した。

f. 溶液を滅菌食塩水を用いて濾液がペントースおよびシアン化物イオンが陰性になるまで繰返し限外濾過

した。

【0072】最終複体の性質

第11表は、酸化されたPRPの種々のバッチからのPRP-CRM₁₉₇ および種々の複合物から得られるロットの種々の性質を表わす。

第 11 表
CRM-PRP複体の生産物

番号	PRP 糖類のバッチ	反応混合物中の PRP/CRM比 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)	最終複合体中の PRP/CRM 比 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)	Kd * (CL-4B)
5	2番	1.0	0.25	0.27
6	2番	2.0	0.62	0.31
7	3番	1.0	0.38	0.36
8	3番	2.0	0.57	0.44
9	6番	1.0	0.60	0.48
10	6番	2.0	0.42	0.48
11	7番	1.0	0.27	0.30
12	7番	2.0	0.42	0.48

* 50%の物質(タンパク質)が溶出するときのKd

ボトリング

a. CRM-PRP複合体を0.8ミクロンついで0.22ミクロンのフィルターを用いて滅菌濾過して秤量した滅菌容器に移した。

b. 試料を無菌的に除去し、ローリー検定によりタンパク質を分析した。

c. 濾過した物質の容量を容器を秤量することにより測定し、最終容量を計算したところ、ml当たり50 μg のタンパク質が得られた。

d. 滅菌食塩水中の1%チメロサル(Thimerosal)

の量を0.22ミクロンの滅菌フィルターを通じて添加し、最終溶液中の0.01%のチメサロールを得た。

e. ワクチンを0.22ミクロンのフィルターを通じて濾過した滅菌食塩水で最終容量にした。

f. 溶液を混合し、かつ5.5mlを、(ブチルグレイゴム, Wheaton)で密栓し、密閉して2~8℃で貯蔵した滅菌して発熱物質のない10mlのガラスビンに移した。

【0073】

最終投薬配合例*

ワクチンロット 番 号	タンパク質 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PRP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Kd **
5	50	12.5	0.27
6	50	31.0	0.31
7	50	19.0	0.36
8	50	28.5	0.44
9	50	30.0	0.48
10	50	21.0	0.48
11	50	13.5	0.30
12	50	21.0	0.48

* 配合例は全て0.9% NaClおよび0.01%のチメロサル内で調製した。

**50%の物質(タンパク質)が溶出するときのKd

試験管内抗原性試験

PBS0.05%トウィーン中のワクチンの一連の希釈物を、ジフテリアトキソイドで予め被覆したマイクロタイマープレートのウェルに2個ずつ添加した。ついで、アールされた高力価のポリクローナルヒトジフテリア抗

毒素血清またはヒトポリクローナル抗PRP血清をウェルに添加し、このプレートを20℃で24時間インキュベートした。抗体結合を、酵素で標識した抗ヒト免疫グロブリンでウェルのインキュベーションし、さらに酵素基質とともに60分間インキュベーションして、光学密

度を定量することにより測定した。結果を第12表に示す。

【0074】

第 12 表

PRP-CRM複合体の試験管内抗原性
ヒトポリクローナル抗ジフテリアトキソイド
および抗PRP抗体の結合の阻害

ワクチン	結合に関するインヒビターの当量	
	抗PRP	抗DIP トキソイド
PRP	(1)	-
DT-Mass *	-	(1)
ロット 5番	1.5	87.0
ロット 6番	1.1	57.0
ロット 7番	3.3	9.3
ロット 8番	2.9	8.0

* マサチューセッツ・パブリック・ヘルス・バイオリジック・ラボラトリーズから提供されたジフテリアトキソイド、ロットDcp27

第12表のデータは、ワクチンの種々のロットが試験管内抗原性を保有することを示している。すなわち、これ

第 13 表

PRP-CRM複合体の種々のロットに対する
離乳ウサギにおける抗PRP応答

ワクチンロット 番 号	0週間	1週間	3週間
	$\mu\text{g}/\text{ml}$ (GMT)	$\mu\text{g}/\text{ml}$ (GMT)	$\mu\text{g}/\text{ml}$ (GMT)
5	0.1	0.23	7.56
6	0.1	0.38	2.86
7	0.2	0.86	9.70
8	0.1	0.87	7.61
9	0.1	0.36	3.88
10	0.1	0.92	1.84
11	0.1	0.21	5.01
12	0.1	0.31	2.33

ヒト幼児における免疫原性

幼児被験者は健康であり、かつヒブ(Hib)ワクチンによるさきの免疫は有しておらずまたワクチンに対する重大な副反応の既応も有していなかった。第14表(それぞれ18, 7および2ヶ月)に示す年齢の始めに、これらを採血し、PRP-CRM複合体の25 μg の皮下第1注射を与え、少なくとも20分間観察し、かつ観察のためにその両親にわたり、可能な局所的および全身的副反応を記録した。

【0076】7ヶ月および2ヶ月のグループについては、第14表に示す時間の経過後に、同一ワクチンによる第2免疫化のためにこの方法を繰返した。さらに時間

第 14 表

25 μg のワクチンに対する抗PRP抗体応答

ワクチン	小児の	抗 体	$\mu\text{g}/\text{ml}$ *
投与年齢(月)	数	前	1回後 2回後

らはPRPおよびジフテリアトキソイドに対するポリクローナル抗体と競合する。このデータはまた、PRP抗原が比較的露出しており、一方、ジフテリアトキソイドエヒトープはあまり露出しておらず、また変わりやすく露出していることを示す。

動物における免疫原性

a. ウサギ

第13表は、25 μg のワクチンで0, 1および2週間で若いウサギにワクチン投与した三つの実験を示す。全てのワクチンは、免疫原性でありかつELISA検定により測定されたようにブースター可能な抗PRP応答を与えることを示す。適度な抗PRP応答が25 μg の複合体ワクチンの1回の注射後でもみられた。

b. マウス

若いスイスウェブスターマウスのワクチン投与により得られた結果は、再びブースター可能な抗PRP応答(データは示さず)を示した。

【0075】

が経過したのち(第14表参照)これらは再び第2応答測定のために採血された。第14表からわかるように、単一注射は、18ヶ月および7ヶ月齢のグループにおける抗体増加に有効であり、一方、2ヶ月齢の幼児では(母方のIgG抗体の減少が期待されているにもかかわらず)抗体の適度の増加が観察された。全ての幼児で、抗PRP抗体の適当なレベルが第2免疫化後1~2ヶ月で観察された。2回の免疫化後の6ヶ月齢の幼児において観察された応答は、抗体の保護レベルを誘発するに充分であった。

【0077】

18-23	84	0.40	1月	6.53	
7-15	88	0.15	1~2月	4.54	1~2月 18.9
2-6	30	0.17	2月	0.25	2月 1.23

* 幾何平均力価

11. 実施例：ジフテリアトキソイドに対する過ヨウ素酸塩で酸化された肺炎球菌多糖類のカップリング

第15表は、過ヨウ素酸塩で酸化された型の肺炎球菌多糖類がジフテリアトキソイドにカップリングされている種々の実験の概略を示す。この表に示された型の肺炎球菌莢膜多糖類(PnPS)は、表示された量の過ヨウ素酸ナトリウムと37℃で90分間反応させ、ついでセントリコン-10(Centricon-10)限外濾過装置(アミコン)で濾過することにより回収された。

【0078】酸化されたPSは、全容量0.75ml中の4mgの精製トキソイドロットDcp27および10mgのNaCNBH₃ 37℃でpH8で3日間反応させた。タンパク質画分を沈澱により回収し、90%の飽和硫酸アンモニウムで洗浄した。PnPS抗原当量は、PnPSおよび¹⁴C標識PnPSに対するヒト血清を用いて放射性抗原結合阻害により検定した。

【0079】

第 15 表

還元アミノ化によるジフテリアトキソイドに対する過ヨウ素酸塩で酸化された肺炎球菌多糖類(PnPS)のカップリング

PnPS タイプ	10mg PSと反応するIO ₄ μmol	カップリング反応後のタンパク質画分 において回収されたPnPS抗原活性 (μgPS/ μgタンパク質)
3	50	0.1
6A	4	0.2
12	4	0.1
14	6	0.1
23	4	0.1

ある具体例に対する特定のものについて本発明を記述したので、本発明の理解後には本発明が関連する当業者にとっては、種々の変更ないし変性は添付の請求の範囲に

より定義されているような本発明の精神および範囲を逸脱しない限りなされ得る。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	弁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K	39/102		A 6 1 K	39/102
	39/104			39/104
	39/108			39/108

(72)発明者 エビー, ロナルド ジョン
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 14623
ロチェスター, ウェスト スクワイヤ
ドライブ 297